

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
27. September 2001 (27.09.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/71026 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/03133

(22) Internationales Anmeldedatum:
19. März 2001 (19.03.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 13 667.2 20. März 2000 (20.03.2000) DE
100 49 364.5 5. Oktober 2000 (05.10.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): ADNAGEN AG [DE/DE]; Ostpassage 7, 30853 Han-
nover-Langenhagen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WASCHÜTZA, Ste-
fanie [DE/DE]; Mühlenweg 11, 29227 Celle (DE).

(74) Anwalt: PFENNING, MEINIG & PARTNER GBR;
Mozartstrasse 17, 80336 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: KIT, METHOD AND MICROARRAY FOR DETERMINING THE SEX OF A HUMAN FOETUS

WO 01/71026 A2

(54) Bezeichnung: KIT, VERFAHREN UND MIKROARRAY ZUR BESTIMMUNG DES GESCHLECHTES EINES MENSCH-
LICHEN FÖTUS

(57) Abstract: The invention relates to a diagnosis kit for determining the sex of a human foetus from a maternal blood sample,
comprising at least one pair of oligonucleotides (reverse primer, forward primer), the two oligonucleotides of a pair being suitable as
a primers for amplifying one of the two complementary strands of the DNA segment sought, respectively, by means of polymerase
chain reaction, said DNA segment being part of the human Y chromosome.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Diagnose-Kit für die Bestimmung des Geschlechtes eines menschlichen Fötus
aus einer mütterlichen Blutprobe mit mindestens einem Paar Oligonukleotide (Reverseprimer, Forwardprimer), wobei die beiden
Oligonukleotide eines Paares als Primer zur Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion jeweils eines der beiden komplemen-
tären Stränge eines gesuchten DNS-Abschnittes geeignet sind, der Teil des menschlichen Y-Chromosomes ist.

Kit, Verfahren und Mikroarray zur Bestimmung des Geschlechtes eines menschlichen Fötus

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Diagnose-Kit, ein Verfahren, ein Mikroarray sowie deren Verwendung zur Bestimmung des Geschlechtes eines menschlichen Fötus. Derartige Diagnose-Kits, Verfahren und Mikroarrays werden im Bereich der Medizin, insbesondere der Pränatal-Diagnose, verwendet.

Ziel derartiger Pränatal-Diagnosen ist es, das Geschlecht eines Kindes im Rahmen der jeweiligen gesetzlichen Bestimmungen zu einem möglichst frühen Zeitpunkt der Schwangerschaft zuverlässig zu erfassen. Hierfür stehen nach dem Stand der Technik zum einen ab der 9. Schwangerschaftswoche sowohl die Chorionzottenbiopsie als auch die Amniozentese zur Verfügung. Beide Verfahren sind jedoch invasiv und risikobehaftet, da es in der Folge derartiger Eingriffe zu einem spontanen Abort oder Verletzungen des Fötus

kommen kann.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein Diagnose-Kit, ein Verfahren, ein Mikroarray sowie Verwendungen hierfür anzugeben, mit denen eine sehr frühzeitige, sichere, nicht-invasive und zuverlässige Bestimmung des Geschlechtes eines menschlichen Fötus möglich ist.

Diese Aufgabe wird durch das Diagnose-Kit nach Anspruch 1, das Verfahren nach Anspruch 24, den Mikroarray nach Anspruch 21 sowie die Verwendung nach Anspruch 31 gelöst. Vorteilhafte Weiterbildung des erfindungsgemäßen Diagnose-Kits, Verfahrens sowie des Mikroarrays bzw. der erfindungsgemäßen Verwendung sind in den jeweiligen abhängigen Ansprüchen gegeben.

Das erfindungsgemäße Diagnose-Kit enthält mindestens ein Paar Oligonukleotide, die als Reverseprimer und Forwardprimer bei der Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion erforderlich sind. Derartige Oligonukleotide werden auch bei dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt. Die Oligonukleotide der Paare sind dabei so ausgesucht, daß bei Einsatz dieser Oligonukleotide in einer Polymerasekettenreaktion ein DNS-Abschnitt einer menschlichen DNS erfolgt, der Teil der DNS des menschlichen Y-Chromosomes ist. Erfolgt eine Amplifikation eines DNS-Abschnittes bei einer derart durchgeführten Polymerasekettenreaktion, so kann einfach festgestellt werden, ob ein Y-Chromosom in der untersuchten DNS-Substanz vorliegt oder nicht. Folglich läßt sich sicher feststellen, ob der Fötus männlichen (Y-Chromosom positiv) oder weiblichen Geschlechts (Y-Chromosom negativ) ist.

Vorteilhafterweise weisen die Oligonukleotide die

folgenden Sequenzen auf:

GAA TGT ATT AGA ATG TAA TGA ACT TTA und
TTC CAT TCC ATT CCA TTC CTT TCC TTT,

wobei letztere Sequenz vorteilhafterweise mit dem Fluorophor Carboxyfluorescein markiert ("Fam") ist. In diesem Falle kann ein einfacher Nachweis amplifizierter DNS über die von diesem ausgesandte Fluoreszenzstrahlung erfolgen, beispielsweise mittels des Gerätes PE ABI Prism Genetic Analyzer 310TM der Firma PE Biosystems:

Vorteilhafterweise werden bei dem Verfahren eingesetzt bzw. enthält das Diagnose-Kit ein zweites Primerpaar, das zur Amplifikation einer DNS geeignet ist, die Teil des menschlichen X-Chromosomes ist. In diesem Falle ist es weiterhin möglich, das grundsätzlich immer vorliegende fötale X-Chromosom sowie die beiden mütterlichen X-Chromosomen zu detektieren bzw. bei einer quantitativen Auswertung auch das Vorliegen zweier fötaler X-Chromosomen neben den beiden mütterlichen X-Chromosomen zu erfassen. In letzterem Falle liegt dann ein Fötus weiblichen Geschlechtes vor. Grundsätzlich kann jedoch dieses Primerpaar auch dazu verwendet werden, einen Standard bzw. eine Kontrolle für den korrekten Ablauf der Amplifikation zu erhalten.

Dieses zweite Primerpaar enthält vorteilhafterweise zwei Oligonukleotide mit folgenden Sequenzen:

CTG TGC TCT CAA AAC CCA CC und
CAC TGC AGC AAT AAA ATA GT,

wobei die erste dieser beiden Sequenzen mit dem Fluo-

rophor 4,7,2',4',5',7'-Hexachloro-6-Carboxy-fluorescein ("Hex") markiert ist. Die Auswertung erfolgt dann wie oben beschrieben.

Vorteilhafterweise enthält das Diagnose-Kit weiterhin die zur Durchführung einer Polymerasekettenreaktion erforderlichen Substanzen, wie sie bereits von verschiedenen Herstellern angeboten werden.

Der Nachweis des Y-Chromosoms kann auch mittels eines Oligonukleotid-Mikroarrays, z.B. eines DNA-Chips, erfolgen, wobei die einzelnen Zellen des Chips Oligonukleotide aufweisen, die spezifisch mit bestimmten Abschnitten der DNS des Y-Chromosoms hybridisieren. Zum Aufbau und Einsatz von DNS-Chips wird allgemein beispielhaft auf die EP 0 373 203 verwiesen. Der Nachweis kann dabei ohne Amplifikation direkt oder auch erst nach Amplifikation des gesuchten DNS-Abschnittes erfolgen. In gleicher Weise kann der Nachweis ohne oder erst nach Restriktionsverdau der DNS des Y-Chromosoms bzw. eines amplifizierten DNS-Abschnittes hiervon in kleinere DNS-Abschnitte durchgeführt werden.

Das erfindungsgemäße Diagnose-Kit, das erfindungsgemäße Verfahren sowie der erfindungsgemäße Mikroarray besitzen den großen Vorteil, daß jeder Laborarzt und jedes medizinische Labor sowie jedes wissenschaftliche Labor, das derartige Untersuchungen durchführen möchte, die wesentlichen bzw. sämtliche aufeinander abgestimmte Substanzen gegebenenfalls in einem einzigen Diagnose-Kit zur Verfügung erhält, so daß die aufwendigsten bzw. jegliche Vorbereitungsarbeiten für die Labore entfallen und auf einfache Weise das Geschlecht eines Fötus bestimmt werden kann. Insbesondere sind die Primer-Oligonukleotide bereits entwik-

kelt und ausgetestet, so daß die Hauptarbeit bei der Entwicklung entsprechender Amplifikationsprozeduren entfällt. Denn die Auswahl geeigneter Oligonukleotide, die dann in der Praxis auch tatsächlich zu dem gewünschten Resultat führen, ist keineswegs trivial und für ein medizinisches oder wissenschaftliches Labor nicht ohne weiteres durchzuführen.

Damit ist es erstmals möglich, die Bestimmung des Geschlechtes eines Fötus aus dem Blut der Mutter nicht-invasiv im großen Maßstab und am jeweiligen Ort auf einfache und kostengünstige Weise durchzuführen. Denn hierzu benötigt der einzelne Laborarzt bzw. das einzelne medizinische Labor lediglich noch eine Tisch-zentrifuge, einen herkömmlichen Thermocycler (PCR-Gerät) sowie gegebenenfalls ein Gerät zur Auftrennung der einzelnen amplifizierten DNS-Fragmente. Derartige Geräte sind jedoch in vielen medizinischen Labors bereits vorhanden.

Dies kann beispielsweise eine Gelelektrophorese-Einheit oder eine Kapillarelektrophoresegerät sein. Ein derartiges herkömmliches Kapillarelektrophoresegerät wird beispielsweise von PE BiosystemsTM unter dem Namen "PE ABI Genetic Analyzer 310"TM vertrieben. Entsprechende Thermocycler für die Amplifikation der DNS werden beispielsweise von der Firma PE BiosystemsTM unter dem Namen "Gene Amp 2400"TM bzw. auch "Gene Amp 9700"TM vertrieben.

Statt einer analytischen Auftrennung der Amplifikate kann, wie oben beschrieben, der erfindungsgemäße Nukleotid-Mikroarray eingesetzt werden, wobei die entsprechenden Amplifikate mit entsprechenden Oligonukleotiden bestimmter Zellen des Mikroarrays hybridisieren und deren Bindung so nachgewiesen wird.

Erfindungsgemäß kann das Diagnose-Kit und das Verfahren sowie der Mikroarray auch dahingehend weitergebildet werden, daß im Falle des Diagnose-Kits nicht nur Oligonukleotide für die Bestimmung des Geschlechtes des Fötus wie oben beschrieben, sondern auch weitere Oligonukleotid-Paare für weitere Bestimmungen beigegeben bzw. im Falle des Verfahrens oder Mikroarrays verwendet werden.

In diesem Falle ist es dem Anwender möglich, auf einfache Art und Weise nicht nur eine Bestimmung des Geschlechtes des Fötus, sondern zugleich auch weitere molekularbiologische Tests durchzuführen.

Erfindungsgemäß wird das Verfahren, das Diagnose-Kit bzw. der Mikroarray verwendet, indem zuerst eine maternale Blutprobe genommen wird. Diese maternale Blutprobe kann nun auf verschiedene Weise weiterverarbeitet werden.

Zum einen werden die DNS-haltigen Bestandteile der maternalen Blutprobe anschließend aufkonzentriert. Dies erfolgt beispielsweise durch Blutsatz, gegebenenfalls unterstützt durch Anzentrifugation zur Beschleunigung der Sedimentation der zellulären Bestandteile. Durch diesen Schritt konzentriert sich die Zellfraktion in einem Blutsatz, der sich für die nachfolgende DNS-Isolierung eignet.

Der Blutsatz wird aufgenommen und eine Lyse der mütterlichen Erythrozyten sowie der nukleierten fötalen Erythrozyten durchgeführt, wodurch die DNS aus den fötalen Erythrozyten freigesetzt wird.

Anschließend erfolgt eine hochtourige Zentrifugation,

beispielsweise bei 50.000 g für 30 Minuten, die zu einer Pelletierung von Zellen der Mutter und des Fötus (z.B. Lymphozyten), der aus den fötalen Erythrozyten freigesetzten DNS des Fötus sowie zellfreier DNS vom Fötus mit Herkunft aus diversen Zelltypen, führt.

Daraufhin wird das Pellet aufgenommen und es erfolgt eine Lyse der Lymphozyten sowohl mütterlicher als auch fötaler Herkunft. Nach Proteinfällung werden die Proteine abzentrifugiert. Im Überstand befindet sich dann freie DNS der Mutter und des Fötus.

Dieser Überstand wird abzentrifugiert. Das Pellet enthält dann die DNS von Mutter und Fötus und wird anschließend rehydriert.

Zum anderen kann für die Gewinnung der nachzuweisenden DNS neben Gewebeproben oder forensischen Proben des Fötus selbst oder Amnionflüssigkeit auch das Plasma/Serum der maternalen Blutprobe verwendet werden. Hierfür wird gegebenenfalls zuerst mittels Blutsatz die Zellfraktion der Mutter und des Fötus in der Blutprobe absinken lassen oder durch Anzentrifugieren abgetrennt. Der Überstand enthält dann zellfrei DNS, insbesondere zellfreie fötale DNS. Diese zellfreie DNS aus dem Plasma/Serum kann nun direkt abgetrennt werden. Bei diesem Verfahren wird der Anreicherungsschritt für die Zellen aus der ersten Variante vermieden. Denn eine Anreicherung oder Trennung der im Plasma/Serum enthaltenen DNS von Mutter und Fötus ist nicht erforderlich, da in dem Plasma/Serum etwa 800 mal mehr fötale DNS vorhanden ist als fötale DNS aus fötalen Zellen, die im mütterlichen Blut zirkulieren. Der Anteil der fötalen DNS an der gesamten im Plasma enthaltenen DNS liegt zwischen ca. 3 % und 7 %. Ins-

gesamt nimmt dabei die zellfreie fötale DNS im Laufe der Schwangerschaft stetig zu, im letzten Trimester der Schwangerschaft so gar sehr stark.

In einem weiteren Schritt kann dann diese zellfreie fötale DNS aus dem Plasma/Serum in herkömmlicher Weise, beispielsweise mit kommerziell erhältlichem Kit, isoliert werden und ist damit für die weitere Untersuchung zugänglich.

Sowohl die DNS, die aus den fötalen nukleierten Zellen aus der maternalen Blutprobe als auch die DNS, die aus dem Serum/Plasma der maternalen Blutprobe gewonnen wurde, wird anschließend weiterverarbeitet, indem eine spezifische Amplifikation der nachzuweisenden DNS-Abschnitte in der in dem Pellet enthaltenen DNS mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) bzw. Multiplex-PCR durchgeführt wird. Hierzu werden nun das erfindungsgemäße Diagnose-Kit bzw. die darin enthaltenen Primer-Paare verwendet.

Anschließend wird die amplifizierte DNS nachgewiesen. Dies kann einerseits durch einen erfindungsgemäßen Mikroarray oder auch durch Auftrennen über Gelelektrophorese erfolgen. Sofern eines der Oligonukleotide aus einem Primer-Paar mit einem Fluorophor markiert ist, kann der Nachweis auch über die Detektion der entsprechenden Fluoreszenz erfolgen. Dies kann beispielsweise mittels eines Genetic Analyzers 310TM der Firma PE BiosystemsTM erfolgen. Letzteres Verfahren weist eine sehr hohe Sensitivität und Zuverlässigkeit auf.

Die erhaltenen Fluoreszenzdaten werden ausgewertet und als Nachweis für das Geschlecht des Fötus eingesetzt.

Wird beispielsweise wie oben beschrieben oder auch an einer Zelle eines Mikroarrays eine Fluoreszenz erfaßt, die von einem Oligonukleotid herrührt, das zu dem Primer-Paar gehört, das zur Amplifikation eines DNS-Abschnittes aus einem Y-Chromosom geeignet ist, so liegt zwangsläufig bei dem Fötus das männliche Geschlecht vor, da die mütterlichen Bestandteile in der Blutprobe selbst kein Y-Chromosom aufweisen. Wird zugleich ein Primer-Paar eingesetzt, das zur Amplifikation von DNS geeignet ist, die in dem menschlichen X-Chromosom enthalten ist, so sollte auch diese DNS amplifiziert worden und nachweisbar sein.

Wird lediglich das X-Chromosom nachgewiesen, so kann auf das weibliche Geschlecht des Fötus geschlossen werden.

Bei diesem Verfahren ist zu beachten, daß vorteilhafterweise keine Trennung der Bestandteile der maternalen Blutprobe beispielsweise in eine zelluläre oder nichtzelluläre Fraktion oder beispielsweise in eine Fraktion mit ausschließlich maternalen bzw. ausschließlich fötalen Bestandteilen durchgeführt wird. Das Verfahren ist daher sehr einfach durchzuführen.

Im folgenden sollen einige Beispiele erfindungsgemäßer Kits beschrieben werden.

Figur 1 zeigt ein Trenngel;

Figur 2 zeigt Ergebnisse einer Fluoreszenzauswertung;

Figur 3 zeigt ein weiteres Trenngel;

Figur 4 zeigt eine zu Figur 3 parallele Fluores-

zenzauswertung; und

Figur 5 zeigt eine weitere Fluoreszenzauswertung.

Als Beispiel eines erfindungsgemäßen Verfahrens wurde einer Schwangeren eine frische Blutprobe entnommen und in EDTA-Puffer, beispielsweise in standardisiert kommerziell verfügbaren EDTA-Röhrchen, aufgenommen. Anschließend wurde über Nacht ein Blutsatz durchgeführt. Alternativ kann die Probe auch bei geringen g-Werten anzentrifugiert werden. Von diesem Blutsatz wurden 500 µl in 900 µl Erythrozyten-Lysis-Puffer des Wizard®-Kits der Firma Promega® aufgenommen. Daraufhin wurde in einer Sorvall®-Zentrifuge (Rotor SM 24) für 30 Minuten bei 50.000 g zentrifugiert. Hierdurch werden die vorwiegend maternalen Lymphozyten sowie die nach der Lysis der kindlichen Erythrozyten zellfrei vorliegende DNS pelletiert.

Aus dem Pellet wird nun mittels eines herkömmlichen kommerziellen DNS-Isolierungs-Kit (z.B. Wizard-Kit der Firma Promega®) die DNS isoliert. Die gewonnene DNS wird in 20 µl Rehydrierungs-Lösung gemäß den jeweiligen DNS-Isolierungs-Kit aufgenommen.

Mit der so gewonnenen DNS wird nun eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit den folgenden Primern X1, X2 Y1, Y2 durchgeführt:

```
X1   CTG TGC TCT CAA AAC CCA CC,  
X2   CAC TGC AGC AAT AAA ATA GT,  
Y1   GAA TGT ATT AGA ATG TAA TGA ACT TTA,  
Y2   TTC CAT TCC ATT CCA TTC CTT TCC TTT.
```

Der Primer X1 ist dabei mit dem grünen Fluoreszenzfarbstoff HEX (4,7,2',4',5',7'-Hexachloro-6-

Carboxyfluorescein) und der Primer Y2 mit dem blauen Fluoreszenzfarbstoff FAM (Carboxyfluorescein der Firma PE Biosystems®) markiert.

Das erfindungsgemäße Kit enthält sämtliche Substanzen, die für die PCR nötig sind. Im vorliegenden Beispiel ist dies der folgende PCR-Mastermix:

gDNS	7 µl
Taq-Puffer	10 µl
MgCl ₂	8 µl
Nukleotide	2 µl
Primer X1	1 µl
Primer X2	1 µl
Primer Y1	1 µl
Primer Y2	1 µl
H ₂ O	68,5 µl
Taq-Polymerase	0,5 µl

Taq-Puffer bezeichnet dabei einen Taq DNA Polymerase Storage Buffer (Taq-Buffer B), der in wässriger Lösung enthält: Tris-HCl 20 mM (pH=8,0 bei 25 °C), KCl 100 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM, Glycerol 50 % (v/v), Tween20 0,5 % (v/v), Nonidet-P40 0,5 % (v/v) und beispielsweise von Promega Corp. (Cat.-No: M166B) vertrieben wird.

Als Taq-Polymerase kann eine herkömmliche Polymerase z.B. der Firma Promega® eingesetzt werden. Es werden insgesamt im vorliegenden Beispiel 7 PCR-Reaktionen durchgeführt, die sich durch die verwendete DNS-Template-Konzentration im PCR-Ansatz unterscheiden:

Ansatz 1 (A1):	1000 ng
Ansatz 2 (A2):	500 ng
Ansatz 3 (A3):	400 ng
Ansatz 4 (A4):	300 ng
Ansatz 5 (A5):	200 ng
Ansatz 6 (A6):	100 ng
Ansatz 7 (A7):	50 ng

Die PCR-Reaktion selbst wurde mit folgenden Thermozyklen geführt:

94 °C für 5 Minuten

35 Zyklen mit der folgenden Abfolge:

94 °C für 1 Minute, 55 °C für 45 Sekunden und 72 °C für 45 Sekunden;

abschließend 72 °C für 5 Minuten.

Die Primer X1 und X2 als Forwardprimer und Reverseprimer sind so ausgewählt, daß bei Vorliegen eines X-Chromosomes ein Fragment mit einer Länge von 207 Basenpaaren amplifiziert wird, während die Forward- und Reverseprimer Y1 und Y2 so ausgewählt sind, daß sich bei Vorliegen eines Y-Chromosomes ein Fragment mit einer Länge von 248 Basenpaaren amplifiziert wird. Die Auswertung kann man nun beispielsweise über eine Gelelektrophorese verfolgen, was in Figur 1 dargestellt ist. Hierzu wird ein 2,5 %-iges Gel (Seakem LE® Biozym®) gegossen. Von den einzelnen PCR-Ansätzen wurden nach Amplifikation gemäß dem obigen PCR-Protokoll jeweils 20 µl in die einzelnen Taschen des Agarose-Gels aufgetragen. Weiterhin wurde ein Marker (100 bp-Leiter) aufgetragen und das Gel bei einer

Spannung von 100 mV für 45 Minuten zur Auftrennung laufengelassen.

Figur 1 zeigt die Bahnen der jeweiligen Ansätze A1 bis A7 sowie jeweils benachbart zu A1 bzw. A7 je eine mit S1 bzw. S2 bezeichnete Bahn, die Standards enthalten. Sämtliche Bahnen A1 bis A7 lassen die beiden Banden, die mit X bzw. Y bezeichnet sind, erkennen. Es handelt sich dabei um Banden für Nukleotidlängen von 207 Basenpaaren (X) bzw. 248 Basenpaaren (Y).

Zwar wird bei dem vorgeschlagenen Verfahren bei Verwendung mütterlicher Blutproben als Ausgangsmaterial auch immer mütterliche DNS mitamplifiziert, so daß eine Bande für X-Chromosomen immer vorhanden sein sollte. Die Anwesenheit einer Bande mit 248 Basenpaaren für das Y-Chromosom weist jedoch eindeutig auf das Geschlecht des Fötus als männlich hin.

Erfindungsgemäß ist eine besonders einfache Analyse der PCR-Produkte möglich mittels Genetic Analyzer ABI 310® von PE Biosystems®. Ein derartiger Nachweis ist in Figur 2 für das vorliegende Beispiel dargestellt. Hierbei wurden von den einzelnen PCR-Ansätzen A1 bis A7 jeweils 1:10 Vorverdünnung angelegt und für die ABI-Fragmentanalyse dann jeweils 1 µl der einzelnen Vorverdünnungen verwendet.

Figur 2 zeigt die Ergebnisse der einzelnen PCR-Ansätze A1 bis A7. Es ist leicht zu erkennen, daß auch bei dieser Analysemethode jeweils Fluoreszenz-Peaks nachgewiesen werden, die einer Länge von 207 Basenpaaren (bezeichnet mit X) und 248 Basenpaaren (bezeichnet mit Y) entsprechen. Auch hier steht also das Geschlecht des Fötus als männlich fest. In den jeweiligen Auswertergebnissen sind weitere Peaks mit

S bezeichnet, die einen internen zugegebenen Standard (Rox-Standard) darstellen. Diese Peaks sind nicht in sämtlichen Darstellungen A1 bis A7 einzelnen bezeichnet, entsprechen sich jedoch jeweils.

Mit diesem Verfahren (Genetic-Analyzer 310 ABI) kann mittels fluoreszenzmarkierter Primer eine weitaus höhere Sensitivität als mit herkömmlicher Gelelektrophorese erzielt werden, wodurch sich dieses Verfahren besonders für die vorliegende Erfindung eignet.

Die fötalen Erythrozyten können auch vor der Polymerasekettenreaktion in der maternalen Blutprobe angereichert werden. In einem ersten Beispiel erfolgt die Anreicherung durch eine PercollTM-Dichtegradienten-Zentrifugation. Bei einer konstanten Zentrifugalkraft und Mediumviskosität ist die Sedimentationsrate von Partikeln proportional zur Partikelgröße. Diese Gesetzmäßigkeit nutzt das Verfahren der Dichtegradienten-Zentrifugation, wobei in diesem Beispiel PercollTM als Zentrifugationsmedium verwendet wird. Bei PercollTM handelt es sich um ein Silika-Derivat, das standardmäßig zur Anreicherung/Trennung von subzellulären Partikeln verwendet wird.

Zunächst wird ein kontinuierlicher Percoll-Gradient erzeugt, der einen Dichtebereich von 1,02 - 1,13 g/ml abdeckt. Dafür werden 14 ml einer PercollTM-NaCl-Lösung (0,15 M NaCl), die eine Dichte von 1,07 g/ml aufweist, 30 min bei 20000 g in einem Festwinkelrotor Typ F 0630 (Beckman Coulter) zentrifugiert. Anschließend wird der so erzeugte kontinuierliche Gradient mit 5 ml EDTA-Vollblut, d.h. in EDTA-Puffer beispielsweise in standardisierten, kommerziell verfügbaren EDTA-Röhrchen, aufgenommenes Vollblut, überschichtet und 15 min bei 1000 g zentrifugiert. Nach

diesem Zentrifugationsschritt verbleiben u.a. die Thrombozyten in der Serumschicht oberhalb des Gradienten und werden mit einer Pasteurpipette entfernt. Ein zweiter Zentrifugationsschritt bei 1000 g für 15 min führt schließlich zur Trennung der verbliebenen, unterschiedlichen Blutzelltypen entsprechend ihrer jeweiligen isopycnischen Dichten. Die Sedimentationschicht mit mono-nuklearen Blutzellen wird anschließend mit einer Pasteurpipette entnommen, dreimal mit Phosphat-Puffer-Saline (PBS, pH=7,4) gewaschen und schließlich in 1 ml PBS resuspendiert. Phosphat-Puffer-Saline (PBS, pH=7,4) enthält in wässriger Lösung KCl 0,2 g/l, KH_2PO_4 0,2 g/l, NaCl 8,0 g/l und Na_2HPO_4 1,15 g/l und wird beispielsweise von Life Technologies (Cat.-No.: 14190-094) vertrieben. Die DNS der mononuklearen Blutzellen wird dann durch die Standardprozeduren des "QIAamp Blood Kit" (Qiagen, Hilden) isoliert und kann für eine Multiplex-PCR eingesetzt werden.

In einem zweiten Beispiel wurden die fötalen, kernhaltigen Erythrozyten mittels FACS-Durchflußzytometrie (FACS = fluoreszenzassoziierte Zellsortierung) isoliert. Es erfolgt zunächst eine Anreicherung aller mono-nuklearer Blutzellen mittels Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation (siehe oben). Die Sedimentationsschicht mit mononuklearen Blutzellen wird dabei mit einer Pasteurpipette entnommen, dreimal mit Phosphat-Puffer-Saline (PBS, pH=7,4) gewaschen und schließlich in 1 ml PBS resuspendiert.

Im Anschluß an die Dichtegradienten-Zentrifugation werden 800 µl der erhaltenen Blutzellsuspension für 60 min bei 4 °C mit einem Phycoerythrin-konjugierten monoklonalen Antikörper, Hersteller: BD PharMingen (Cat.No.: 32595A) Klon: GA-R2 (HIR2) Isotype: Mouse

IgG_{2b}, κ gegen das GlycophorinA-Oberflächenprotein und einem Fluorescein-Isothiocyant (T9-FITC)-konjugierten monoklonalen Antikörper, Hersteller: BD PharMingen (Cat.-No.: 30984X) Klon: CB38 (NL07) Iso-type: Mouse IgM, κ gegen den Transferrin-Rezeptor (CD36) inkubiert bzw. markiert. Ein dritter Fluoreszenzkanal wird benutzt für die negative Diskriminierung von T-, B- und NK-Zellen. Die Endkonzentration beider Antikörper beträgt jeweils 0,2 μ g pro 10^7 Zellen. Die markierten Zellen werden zweimal mit PBS gewaschen und im Anschluß werden 10^7 Zellen in 1 ml PBS resuspendiert.

Für die Isolierung kernhaltiger Erythrozyten wird ein FACS Vantage SE-Durchflußzytometer (Becton-Dickinson) verwendet. Das System ist mit einem wassergekühlten Doppelwellenlängen-Argon-Laser (Emissionswellenlängen 488 nm und 365 nm - UV) und einem luftgekühlten Helium-Neon-(HeNe) Laser konfiguriert und mit fluoreszierenden Beads (Becton Dickinson) kalibriert. Das CellQuest Programm, Hersteller: Becton Dickinson, Version: 3.3 (Cat.-No.: 342182) wird verwendet für die Datenaufnahme, Instrumentkontrolle, sowie die statistische Auswertung. Die Sortierung der Blutzellen erfolgt mit Zellraten von 20000 - 25000 Zellen pro Sekunde, wobei die Zellgröße ("forward scatter"), und die Granularität, sowie die Oberflächenstruktur ("side scatter"), die Emission der grünen Fluoreszenz (Transferin-Rezeptor, T9-FITC), die Emission der orangen Fluoreszenz (GlycophorinA, KC16-Rd) sowie die Emission der roten Fluoreszenz für die übrigen Parameter, wie CD45, CD3, CD19 und CD16/56 (APC oder Cy5 markiert), als Selektionskriterien verwendet werden. Um eine zusätzliche Diskriminierung von kernhaltigen Zellen zu gewährleisten wird der Kernfarbstoff Hoechst 33342 eingesetzt. Die Anregung erfolgt

gleichzeitig mit der UV-Linie des Argon-Lasers. Die sortierten Zellen werden direkt in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß, das mit 1 ml PBS gefüllt ist, überführt und können bei -20 °C gelagert werden.

Auch hier kann die DNS der mononuklearen Blutzellen anschließend durch die Standardprozeduren des "QIAamp Blood Kit" (Fa. Qiagen, Hilden) isoliert und für eine Multiplex PCR wie im folgenden beschrieben, eingesetzt werden.

Mit der so isolierten DNS aus kernhaltigen fötalen Erythrozyten wird dann die PCR durchgeführt.

Figur 3 zeigt ein weiteres Beispiel eines Trenngels. Die Probenvorbereitung erfolgte dabei so wie im vorhergehenden Beispiel für die Figuren 1 und 2. Dabei wurde jedoch zum einen eine Probe für einen weiblichen Fötus und einen männlichen Fötus sowie eine Kontrollprobe untersucht. In den Spuren 1 und 7 ist jeweils eine 100 bp-Leiter aufgetragen. Die Spur 2 enthält dabei die Probe für den männlichen Fötus und Spur 4 diejenige für den weiblichen Fötus während Spur 6 die Kontrollprobe enthält. Wie zu erkennen ist, findet sich in Spur 4 lediglich das Fragment mit einer Länge von 207 Basenpaaren, während in Spur 2 sowohl eine Bande bei 207 Basenpaaren als auch eine Bande bei 248 Basenpaaren auftritt.

Figur 4 zeigt die Proben aus Figur 3 nach Analyse mittels einer ABI-Frequenzanalyse. Figur 4A zeigt dabei die Probe für den männlichen Fötus, bei dem sowohl ein Fragment bei 207 Basenpaaren für ein X-Chromosom als auch ein Fragment bei 248 Basenpaaren für ein Y-Chromosom auftritt. In Figur 4B, der Analyse der Probe für den weiblichen Fötus, erscheint dem-

gegenüber lediglich eine Bande bei 207 Basenpaaren, was auf das Fehlen eines Y-Chromosoms hinweist. Die Ergebnisse der Figuren 3 und 4 entsprechen sich folglich vollständig.

Figur 5 zeigt ein weiteres Anwendungsbeispiel, bei dem fötales DNA-Ausgangsmaterial aus EDTA-Vollblut (etwa 5 ml) einer Schwangeren verwendet wurde. Zunächst wird durch Zentrifugation das Plasma der maternalen Blutprobe gewonnen. Zu diesem Zweck wird das EDTA-Vollblut zweimal bei 3000 g für 30 min zentrifugiert. Aus dem Überstand bzw. Plasma wird anschließend über ein handelsübliches DNA-Isolierungs Kit (QIAamp DNA Blood Kit oder QIAamp UltraSens Virus Kit, Qiagen, Hilden) die genomische DNA extrahiert, die neben maternalen Erbmolekülen auch fötales Material enthält. Die extrahierte DNA dient dann als Template für die beschriebene PCR-Reaktion.

Die verwendeten Oligonukleotide für die Polymerasekettenreaktion und die Durchführung der Polymerasekettenreaktion erfolgt wie oben im Beispiel zu den Figuren 1 und 2 beschrieben. Lediglich der PCR-Reaktionsansatz erfolgt wie in der nachfolgenden Tabelle:

	Volumen	Endkonz.
gDNA-Template	22,5 µl	
Taq-Puffer	5 µl	1 x
MgCl ₂	3 µl	1,5 mM
Nukleotide	1 µl	200 µM
Primer X1	1 µl	0,1 µM
Primer X2	1 µl	0,1 µM
Primer Y1	1,5 µl	0,15 µM
Primer Y2	1,5 µl	0,15 µM
H ₂ O	13,0 µl	
Taq-Polymerase	0,5 µl	2,5 U
Reaktionsvolumen	50 µl	

Die Auswertung der PCR-Ansätze erfolgte über eine ABI-Fragmentanalyse wie oben beschrieben. Die einzelnen PCR-Ansätze wurden dabei zunächst unverdünnt eingesetzt, wobei für die ABI-Fragmentanalyse jeweils 1 µl verwendet wurde.

Figur 5 zeigt nun in Figur 5A eine erste Probe aus dem Vollblut einer Schwangeren, die einen weiblichen Fötus trug. Figur 5B zeigt die Ergebnisse einer Probe einer Schwangeren, die einen männlichen Fötus trug. Die Geschlechts-Typisierung der Föten wurde durch zytogenetische Standardverfahren nach Amniozentese verifiziert. Die mütterliche Blutprobe wurde dabei jeweils in der 15. Schwangerschaftswoche genommen.

Figur 5 zeigt nun, daß, wie zu erwarten, für den weiblichen Fötus lediglich ein Peak bei 207 Basenpaaren beobachtet wird, während in Figur 5B für den männlichen Fötus 2 Spitzen bei 207 Basenpaaren und 248 Basenpaaren ermittelt werden. Es handelt sich also in Figur 5B eindeutig um einen männlichen Fötus. Figur 5C zeigt demgegenüber eine Kontrollprobe, die keinerlei DNS aufwies. Dementsprechend wurden auch durch die PCR keine Fragmente vervielfältigt, so daß in Figur 5C lediglich die Marker-Fragmente zu erkennen sind.

Dadurch, daß die vorliegende Erfindung ein entsprechendes Kit zur Durchführung des Verfahrens zur Verfügung stellt, ist es nunmehr jedem Laborarzt oder im medizinischen Bereich tätigen Labor, beispielsweise humangenetischen Labors, ohne weitere Entwicklungstätigkeit ohne weiteres möglich, auf einfache Weise eine Geschlechtsbestimmung für einen Fötus durchzuführen, bei dem die Risiken herkömmlicher Techniken aus-

geschlossen werden können. Weiterhin ermöglicht das erfindungsgemäße Kit eine sehr rasche Geschlechtsbestimmung zum frühest möglichen Zeitpunkt der Schwangerschaft. Der frühest mögliche Zeitpunkt ist dabei nicht durch das erfindungsgemäße Verfahren oder den erfindungsgemäßen Kit eingeschränkt, sondern im wesentlichen durch gesetzliche Regelungen, die erst ab einem bestimmten Zeitpunkt der Schwangerschaft eine Geschlechtsbestimmung erlauben. Eine Geschlechtsbestimmung ist beispielsweise gesetzlich in der Bundesrepublik Deutschland erst nach Ablauf des ersten Trimesters der Schwangerschaft erlaubt. Dann jedoch ist eine rasche und sehr präzise und risikolose Bestimmung des Geschlechtes des Fötus nunmehr möglich.

Patentansprüche

1. Diagnose-Kit für die Bestimmung des Geschlechtes eines menschlichen Fötus mit

mindestens einem ersten Paar Oligonukleotide (Reverseprimer, Forwardprimer),

wobei die beiden Oligonukleotide des ersten Paares als Primer zur Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion jeweils eines der beiden komplementären Stränge eines gesuchten DNS-Abschnittes geeignet sind, und

wobei der gesuchte DNS-Abschnitt Teil der DNS des menschlichen Y-Chromosoms ist.

2. Diagnose-Kit nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens ein zweites Paar Oligonukleotide (Reverseprimer, Forwardprimer) enthält,

wobei die beiden Oligonukleotide des zweiten Paares als Primer zur Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion jeweils eines der beiden komplementären Stränge eines weiteren gesuchten DNS-Abschnittes geeignet sind, und

wobei der weitere gesuchte DNS-Abschnitt Teil der DNS des menschlichen X-Chromosoms ist.

3. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es die zur Durchführung einer Polymerasekettenreaktion erforderlichen Substanzen enthält.
4. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es als zur Durchführung einer Polymerasekettenreaktion erforderliche Substanzen eine Pufferlösung, Magnesiumchlorid, Desoxynukleotid-Triphosphate, sowie eine hitzestabile Polymerase enthält.
5. Diagnose-Kit nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß es als hitzestabile Polymerase eine Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) enthält.
6. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zumindest eines der beiden Oligonukleotide eines Paares von Oligonukleotiden mit einem Fluorophor markiert ist.

7. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es als Positivkontrolle eine DNS-Probe mit dem gesuchten DNS-Abschnitt des X-Chromosoms und/oder des Y-Chromosoms enthält.
8. Diagnose-Kit nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß die DNS-Probe eine klonierte DNS-Probe ist.
9. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zumindest jeweils eines der beiden Oligonukleotide des ersten und/oder des zweiten Paares von Oligonukleotiden mit Fluorophoren markiert sind.
10. Diagnose-Kit nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß die Oligonukleotide des ersten und des zweiten Paares mit denselben Fluorophoren markiert sind.
11. Diagnose-Kit nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Oligonukleotide des ersten und des zweiten Paares mit verschiedenen Fluorophoren markiert sind.
12. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Oligonukleotide des ersten Paares folgende Sequenzen

aufweisen:

GAA TGT ATT AGA ATG TAA TGA ACT TTA und
TTC CAT TCC ATT CCA TTC CTT TCC TTT.

13. Diagnosekit nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß das Oligonukleotid mit folgender Sequenz
TTC CAT TCC ATT CCA TTC CTT TCC TTT
mit dem Fluorophor Carboxyfluorescein markiert ist.
14. Diagnose-Kit nach einem der Ansprüche 2 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Oligonukleotide des zweiten Paares folgende Sequenzen aufweisen:
CTG TGC TCT CAA AAC CCA CC und
CAC TGC AGC AAT AAA ATA GT.
15. Diagnose-Kit nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß das Oligonukleotid mit der Sequenz
CTG TGC TCT CAA AAC CCA CC
mit dem Fluorophor 4,7,2',4',5',7'-Hexachloro-6-Carboxyfluorescein markiert ist.
16. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es
eine Anleitung zur Durchführung einer DNS-Isolierung und/oder
eine Anleitung zur Durchführung der Polymer-

asekettenreaktion und/oder
eine Anleitung zur Durchführung einer Fragment-
analyse enthält.

17. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Schema zur Auswertung der erhaltenen Meßergebnisse enthält.
18. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es einen Nucleinsäure-Mikroarray (DNS-Chip) enthält, wobei der Array eine Anzahl Zellen (Felder) aufweist und in mindestens einer Zelle ein Oligonukleotid angeordnet ist, das mit dem gesuchten DNS-Abschnitt hybridisiert.
19. Diagnose-Kit nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß in mindestens einer weiteren Zelle des Mikroarrays ein weiteres Oligonukleotid angeordnet ist und die Sequenz des Oligonukleotides, das in der mindestens einen Zelle angeordnet ist, sich von der Sequenz des weiteren Oligonukleotides unterscheidet.
20. Diagnose-Kit nach einem der beiden vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in mindestens zwei Zellen jeweils ein Oligonukleotid angeordnet ist, wobei die in verschiedenen Zellen angeordneten Oligonukleotide jeweils mit

verschiedenen gesuchten DNS-Abschnitten hybridisieren.

21. Mikroarray, beispielsweise DNS-Chip, mit einer Anordnung von mehreren, voneinander getrennten Zellen (Feldern), dadurch gekennzeichnet, daß in mindestens einer Zelle ein Oligonukleotid angeordnet ist, das mit einem DNS-Abschnitt hybridisiert, der Teil des menschlichen Y-Chromosoms ist.
22. Mikroarray nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß in mindestens einer weiteren Zelle ein weiteres Oligonukleotid angeordnet ist, wobei die Sequenz des Oligonukleotides, das in der mindestens einen Zelle angeordnet ist, sich von der Sequenz des weiteren Oligonukleotides unterscheidet.
23. Mikroarray nach Anspruch 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet, daß in mindestens zwei Zellen jeweils ein Oligonukleotid angeordnet ist, wobei die in verschiedenen Zellen angeordneten Oligonukleotide mit verschiedenen gesuchten DNS-Abschnitten hybridisieren.
24. Verfahren zur Bestimmung des Geschlechtes eines menschlichen Fötus, dadurch gekennzeichnet, daß in einer maternalen Blutprobe mindestens ein gesuchter DNS-Abschnitt, der Teil der DNS des

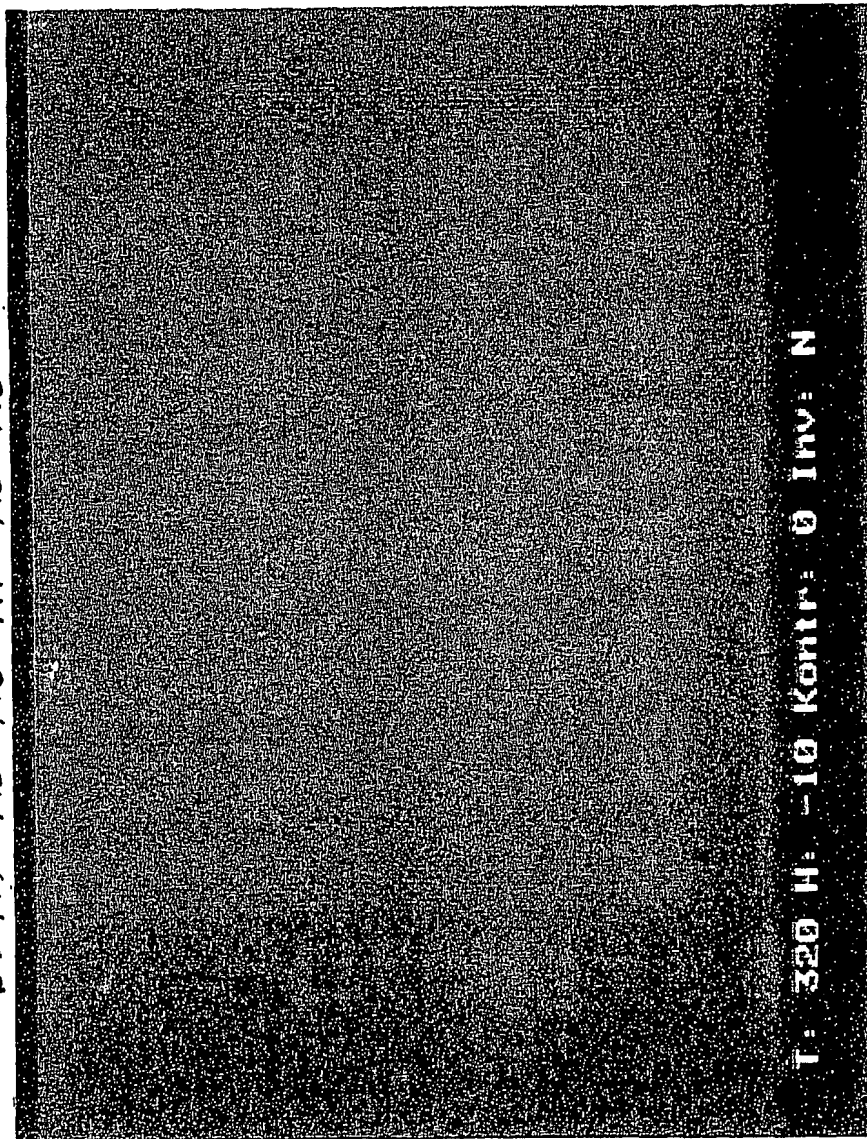
menschlichen Y-Chromosoms ist, durch eine Polymerase-Kettenreaktion mittels mindestens eines Paares von Oligonukleotiden amplifiziert wird, wobei die beiden Oligonukleotide des mindestens einen Paares zur Amplifikation jeweils eines der komplementären Stränge des gesuchten DNS-Abschnittes geeignet sind, und zuletzt die amplifizierte DNS nachgewiesen wird.

25. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß vor der Amplifikation die DNS-haltigen Bestandteile in der maternalen Blutprobe zuerst aufkonzentriert werden.
26. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß zur Aufkonzentration der DNS-haltigen Bestandteile eine Sedimentation der maternalen Blutproben (Blutsatz) durchgeführt wird.
27. Verfahren nach einem der beiden vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zur Aufkonzentration der DNS-haltigen Bestandteile eine Lyse darin enthaltener nukleierter fötaler Erythrozyten durchgeführt und anschließend die zellfrei vorliegende DNS abzentrifugiert und für die weitere Diagnose gewonnen wird.
28. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß aus der maternalen Blutprobe das Blut-

plasma/Blutserum gewonnen wird und anschließend die gesuchten DNS-Abschnitte durch eine Polymerasekettenreaktion mittels der in dem Kit enthaltenen Oligonukleotide amplifiziert werden und zuletzt die amplifizierte DNS nachgewiesen wird.

29. Verfahren nach einem der Ansprüche 24 bis 28, dadurch gekennzeichnet, daß zum Nachweis der amplifizierten DNS die von fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden abgegebene Fluoreszenzstrahlung erfaßt wird.
30. Verfahren nach einem der Ansprüche 24 bis 29, dadurch gekennzeichnet, daß ein Kit nach einem der Ansprüche 1 bis 17 verwendet wird.
31. Verwendung eines Kits, eines Oligonukleotid-Mikroarray und/oder eines Verfahrens nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur pränatalen, nicht-invasiven Bestimmung des Geschlechtes eines menschlichen Fötus.
32. Verwendung nach dem vorhergehenden Anspruch zur pränatalen, nicht-invasiven Bestimmung des Geschlechtes eines menschlichen Fötus aus einer maternalen Blutprobe.

S1 A1 A2 A3 A4 A5 A6 A7 S2



T: 320 H: -10 Kontr: 0 Inv: N

X X
↓ ↓

Fig. 1

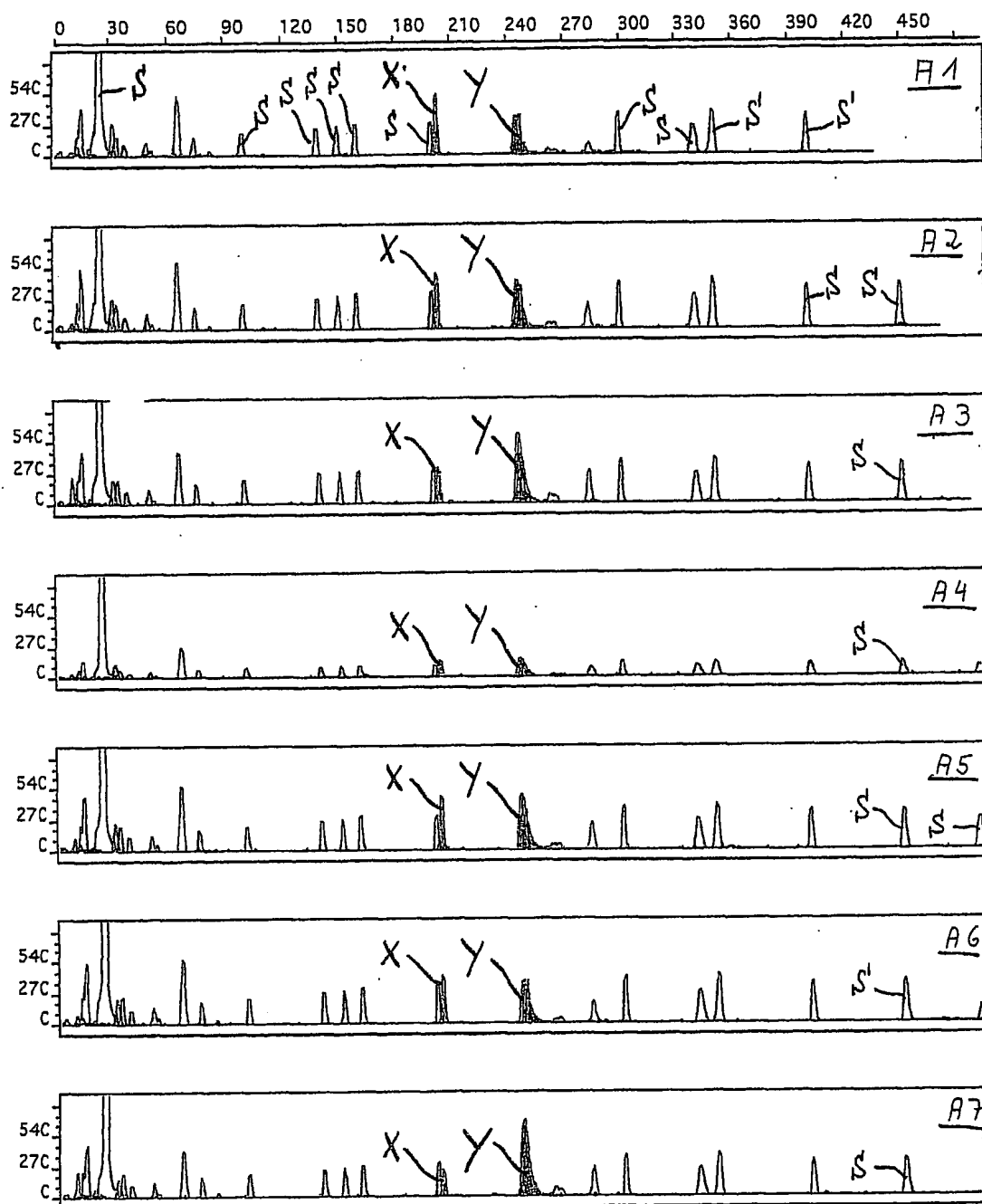


Fig. 2

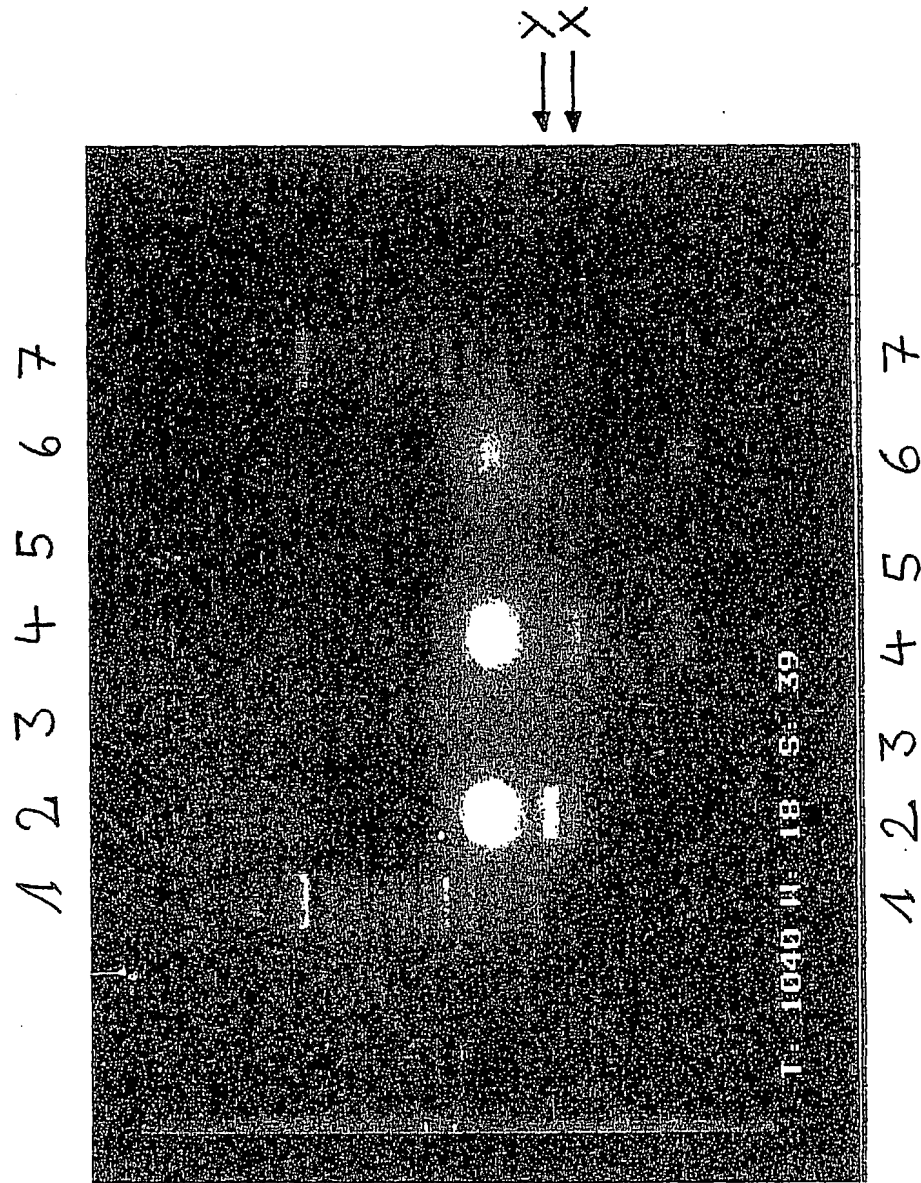
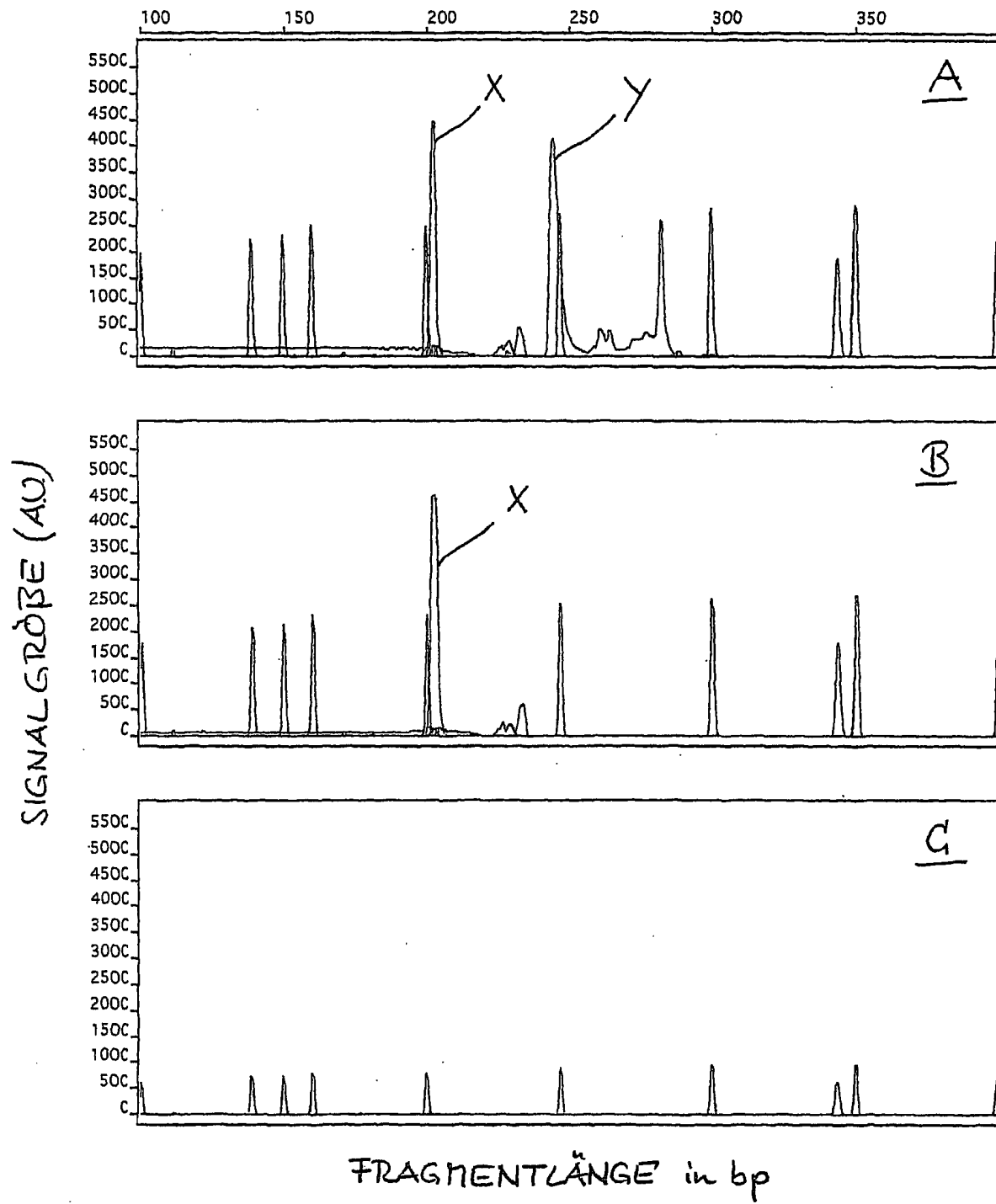


Fig.3



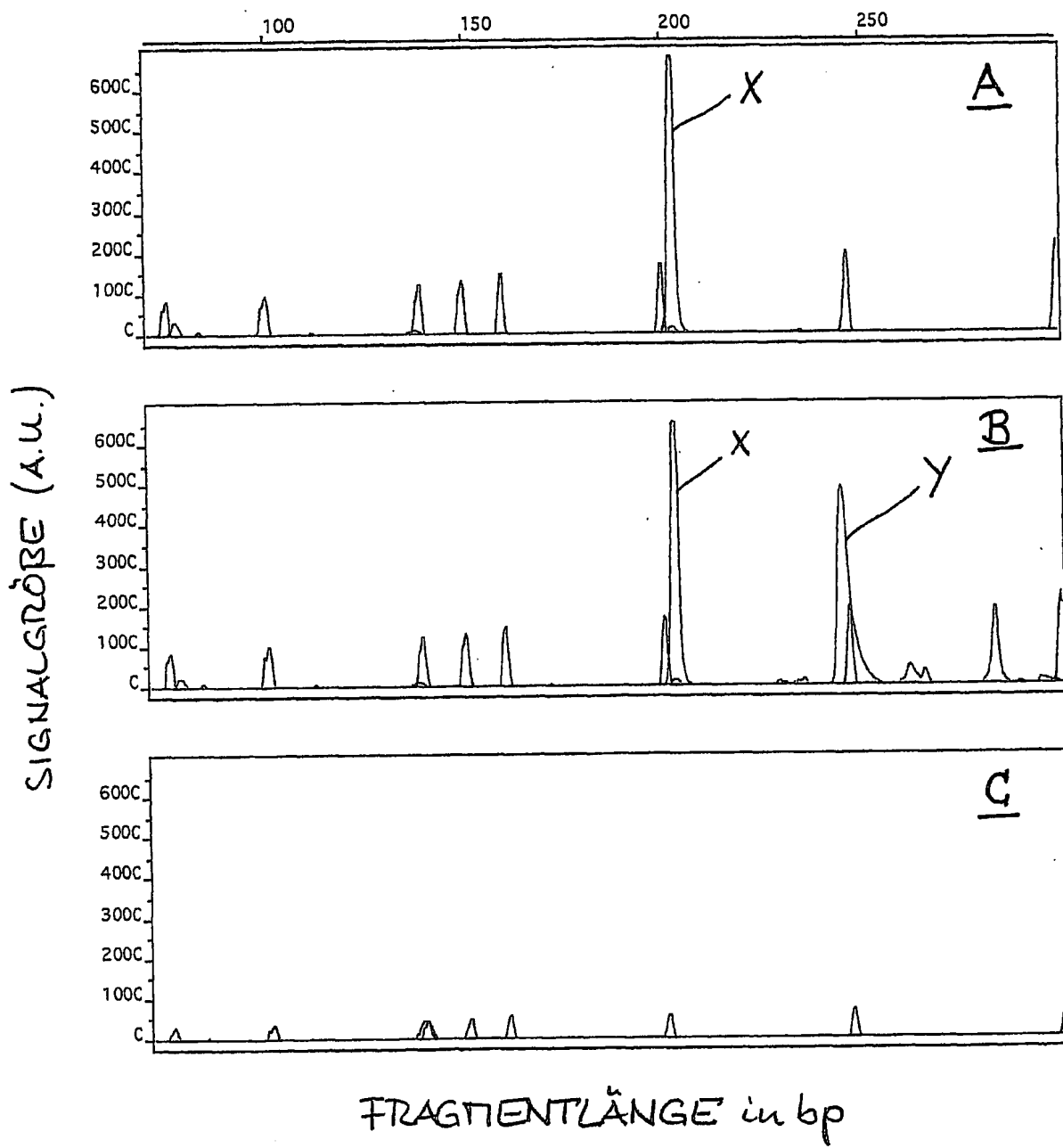


Fig. 5